

Control biológico de *Fusarium graminearum*: utilización de *Trichoderma* spp. y biofumigación con parte aérea de *Brassica juncea*

Biological control of *Fusarium graminearum*: use of *Trichoderma* spp. and biofumigation with aerial part of *Brassica juncea*

Omar Salvador Perniola ¹, Sebastián Staltari ¹, Silvia Elena Chorzempa ², Marta Mónica Astiz Gassó ¹, María del Carmen Molina ^{1,3}

Originales: Recepción: 16/08/2013 - Aceptación: 27/06/2014

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron: determinar la factibilidad de la utilización combinada de dos métodos de control biológico: la aplicación del hongo antagonista *Trichoderma* spp. y la biofumigación con la parte aérea de *Brassica juncea* en el estadio de fin de fructificación; evaluar su efecto sobre el crecimiento del patógeno *Fusarium graminearum*. Se trituraron plantas de *B. juncea* y se colocaron en recipientes de plástico en dosis de 5 y 10 g. Sobre el material triturado se apoyó una caja de Petri con agar papa glucosado al 2%, que contenía un disco con micelio de *F. graminearum* o *Trichoderma* spp. o ambos hongos. Los recipientes de plástico se cerraron e incubaron a 25±2°C en oscuridad durante 7 días. Finalizado este período, se midió el diámetro de las colonias. Se obtuvieron los siguientes resultados: i) cuando se biofumigaron por separado, no se observó efecto fungistático de *B. juncea* sobre *Trichoderma* spp. ni sobre *F. graminearum*; ii) en ausencia del biofumigante, *Trichoderma* spp. inhibió significativamente el crecimiento de las colonias de *F. graminearum*, iii) la combinación de *Trichoderma* spp. y la

ABSTRACT

The aims of this work were: to determine feasibility of the combination of two biological control methods: application of antagonistic fungus *Trichoderma* spp. and biofumigation with the aerial part of *Brassica juncea* in the end of fruiting stage; to evaluate their effect on the growth of the pathogen *Fusarium graminearum*. Two doses (5 and 10 g) of triturated plant material from *B. juncea* were placed in plastic recipients. Petri dishes with potato glucose agar medium 2% and a disc inoculated with *F. graminearum*, or *Trichoderma* spp. or both fungi, were placed on top of the plant material. Plastic recipients were then closed and incubated at 25±2°C in darkness for 7 days. After that, the diameter of the colonies was measured. The results indicated that: i) when *Trichoderma* spp. and *F. graminearum* were biofumigated separately, fungistatic effect was not observed, ii) without biofumigant, *Trichoderma* spp. significantly inhibited growth of *F. graminearum* colonies, iii) the combination of *Trichoderma* spp. and the biofumigation with *B. juncea* showed synergic effect on growth control of *F. graminearum*. These *in vitro* results suggest that the growth of *Trichoderma* spp. and

1 Instituto Fitotécnico de Santa Catalina, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de la Plata. Garibaldi 3400, Llavallol, C. P. 1836, Buenos Aires, Argentina. omarperniola@yahoo.com.ar
2 Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Ruta N° 4, Km 2, Llavallol, C. P. 1836, Buenos Aires, Argentina.
3 CONICET

biofumigación con *B. juncea* mostró un efecto sinérgico sobre el control del crecimiento micelial de *F. graminearum*. Los resultados *in vitro* sugieren que el crecimiento de *Trichoderma* spp. y su potencial efecto de biocontrol sobre *F. graminearum*, no son afectados por la biofumigación con *B. juncea*. La utilización combinada de *Trichoderma* spp. y la biofumigación con *B. juncea*, tendría un efecto sinérgico sobre el control del crecimiento de *F. graminearum*.

its potential biocontrol effect of *F. graminearum*, are not affected by biofumigation with *B. juncea*. Also, the combination of *Trichoderma* spp. and biofumigation with *B. juncea*, would have synergic effect on growth control of *F. graminearum*.

Keywords

in vitro • dual culture • antagonism
• biocontrol • biofumigation •
Brassicaceae

Palabras clave

in vitro • cultivo dual • antagonismo •
biocontrol • biofumigación •
Brassicáceas

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las plantas cultivadas sufren enfermedades causadas por hongos de distintas especies del género *Fusarium* (30). Particularmente, *Fusarium graminearum* Schwabe [Teleomorfo *Gibberella zeae* (Schw.) Petch.] es un patógeno vegetal de significativa importancia económica. Entre las enfermedades que provoca en trigo y otros cereales de invierno se destacan: la fusariosis de la espiga, el pietín y el tizón de plántulas; en maíz causa la podredumbre de la espiga y del tallo (24, 26). En el cultivo de trigo este patógeno adquiere características particularmente deletéreas porque afecta tanto el rendimiento como la calidad de los granos (poder germinativo, vigor, contenido de proteínas, aptitud panadera de la harina y otros parámetros tecnológicos). Al margen de estas deficiencias, la consecuencia más seria de la fusariosis de la espiga de trigo es la contaminación de los granos y sus derivados, con micotoxinas (30).

Fusarium graminearum sobrevive en el suelo en tejidos vivos y muertos, y sus ascosporas, macroconidios, clamidosporas y fragmentos de micelio sirven como inóculo, siendo el rastrojo la fuente de propágulos más significativa (6). En el caso particular de la fusariosis de la espiga de trigo, se emplean diferentes estrategias para su control, que incluyen la utilización de semillas sanas, la rotación de cultivos, la aplicación de fungicidas, el empleo de cultivares resistentes y diferentes prácticas de labranza; no obstante ninguna de estas estrategias aplicadas en forma independiente es capaz de reducir considerablemente el impacto de esta enfermedad (24).

Los métodos de control biológico, integrados a las prácticas culturales, podrían colaborar en la prevención y en la disminución de la incidencia y severidad de las enfermedades provocadas por este patógeno. En este aspecto, se presentan como métodos promisorios la biofumigación y la aplicación del hongo antagonista *Trichoderma* spp. (24, 31, 40).

La biofumigación puede definirse como el control de plagas y patógenos edáficos por medio de la liberación en el suelo de compuestos, en su mayoría volátiles, originados por la descomposición de residuos orgánicos (15). Como biofumigantes se

pueden emplear estiércoles, residuos agroindustriales y de cosechas, incorporación de plantas de Brassicáceas, sorgo, maíz, etc. Durante el proceso de biofumigación, como resultado de la descomposición del material orgánico, se generan en el suelo sustancias con actividad biocida como amonio, ácido acético, compuestos azufrados, etc. Además, si se incorporan al suelo plantas de Brassicáceas, los glucosinolatos presentes en sus tejidos (21), se hidrolizan por la acción de la enzima mirosinasa y se producen diferentes tipos de isotiocianatos, con variable grado de toxicidad frente a hongos patógenos u otros organismos (16, 18, 28, 42). Entre las especies de Brassicáceas más estudiadas como biofumigantes se encuentra *Brassica juncea* L. Czerniak (mostaza parda), que ha demostrado tener efecto fungistático sobre diversos hongos fitopatógenos: *Fusarium sambucinum* Fuckel (23, 25), *Pythium ultimum* Trow (8, 23), *Rhizoctonia solani* Kühn (8, 23, 38), *Phytophthora* spp. (13, 23, 43), *Verticillium dahliae* Kleb. (11, 27), *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W. C. Snyder & H. N. Hansen (11), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (23), *Sclerotinia minor* Jagger (10), *F. graminearum* (31), etc.

Gran variedad de especies fúngicas han sido evaluadas como agentes biocontroladores, no obstante *Trichoderma* spp. se destaca claramente en este tipo de estudios por su facilidad de cultivo y el amplio rango de patógenos que controla (40). Los hongos del género *Trichoderma* son frecuentes en todo el mundo y pueden aislarse fácilmente desde el suelo, de troncos caídos y de otros restos vegetales en descomposición. Clasificados dentro de los hongos imperfectos, poseen una elevada tasa de crecimiento y producen un gran número de esporas asexuales (conidios) de color verde o blanco a partir de células conidiógenas situadas en el extremo de conidióforos ampliamente ramificados (17, 19). Varias especies de este género son de importancia económica dado que sintetizan enzimas industriales (como celulasas y hemicelulasas) y antibióticos. Además poseen acción biocontroladora (22), como consecuencia de la elevada tasa de crecimiento, la producción de metabolitos con actividad antibiótica y la manifestación de micoparasitismo ante diversos patógenos (17). La actividad lítica sobre las paredes celulares de los hongos, debida a la acción de las enzimas 1,3- β -glucanasa y quitinasa, es uno de los principales mecanismos responsables de la actividad antagonista sobre patógenos de suelo (36). Adicionalmente, en algunas especies del género *Trichoderma* se reportó la capacidad de inducir resistencia en plantas como otro mecanismo de biocontrol (7, 41).

Diversos autores determinaron la capacidad biocontroladora de distintas especies del género sobre un amplio rango de patógenos. *Trichoderma harzianum* Rifai, posiblemente la especie más estudiada, manifestó efecto antagonista sobre *R. solani*, *Sclerotium rolfii* Sacc., *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitz (36), *Aphanomyces cochlioides* Drechsler, *Phoma betae* (A. B. Frank), *Acremonium cucurbitacearum* Alfaro-García, W. Gams et J. García-Jiménez, *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis & Shoemaker (17), *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* S.I. Cohen & Heald (2), *F. oxysporum* f. sp. *cumini* (Foc), *Alternaria burnsii* Uppal, Patel & Kamat (12), *Phytophthora capsici* Leonian, *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler, *P. ultimum*, *S. sclerotiorum* (40), *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (37) y *Colletotrichum dematium* (Pers. ex Fr.) Grove (35). Asimismo,

Trichoderma hamatum (Bonord.) Bain. exhibió efecto biocontrolador sobre *R. solani*; *Trichoderma longibrachiatum* Rifai sobre *P. ultimum*; *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. sobre *R. solani*; *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) v. Arx sobre *Pythium arrhenomanes* Drechsler, *P. ultimum*, *R. solani*, *F. graminearum* (40), *F. o. cumini* y *A. burnsii* (12); *Trichoderma gamsii* Samuels & Druzhinina y *Trichoderma velutinum* Bissett, C.P. Kubicek & Szakacs manifestaron biocontrol sobre *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. y *F. graminearum* (24).

Los conocimientos actuales sobre la técnica de biofumigación refieren principalmente al biocontrol de organismos perjudiciales para los cultivos, pero es limitada la información relativa a su efecto sobre la flora y fauna benéfica. En este aspecto, los antecedentes del efecto de la biofumigación sobre hongos del género *Trichoderma* son escasos. Kirkegaard & Matthiessen (2004) argumentaron que son necesarias bajas concentraciones de isotiocianatos para detener el crecimiento de ciertos patógenos como *Sclerotinia* spp. o *Pythium* spp., pero para afectar a *Trichoderma* spp. se requieren dosis treinta veces superiores. En pruebas *in vitro*, Sanchi *et al.* (2005) observaron que *S. sclerotiorum* y *S. minor* fueron más sensibles que la cepa T39 de *T. harzianum* a los isotiocianatos liberados por *Brassica carinata* Braun. Por otro lado, Dandurand *et al.* (2000) reportaron que la biofumigación con *Brassica napus* L. puede ser incompatible en combinación directa con *T. harzianum*.

Objetivos

- Determinar la factibilidad de la utilización combinada de dos métodos de control biológico: la aplicación del hongo antagonista *Trichoderma* spp. y la biofumigación con *B. juncea*.
- Evaluar su efecto sobre el crecimiento del patógeno *F. graminearum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y fúngico

El material vegetal utilizado para la biofumigación fue la parte aérea de plantas de *B. juncea* (mostaza parda), cultivadas en el campo experimental del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina (IFSC), Llavallol, Argentina. El cultivo se sembró en mayo de 2012; cuando alcanzó el estadio de fin de fructificación (en octubre del mismo año), se cosechó la parte aérea.

La cepa de *F. graminearum* utilizada fue la LM2010, identificada por el Instituto Fitotécnico de Santa Catalina y el Centro de Referencia de Micología, Universidad Nacional de Rosario (CEREMIC - UNR).

El hongo *Trichoderma* spp. se obtuvo del producto comercial Biagro TL® (5×10^8 conidios de *Trichoderma* spp. x ml⁻¹), formulado biológico generado a través de un convenio de vinculación tecnológica entre el IFSC y el laboratorio Biagro S. A., a base de cepas nativas aisladas del campo experimental del IFSC (3, 4, 5).

Procedimientos *in vitro*

Evaluación del efecto biofumigador de B. juncea sobre Trichoderma spp. y F. graminearum.

El ensayo realizado para determinar el efecto biofumigador de *B. juncea* sobre el crecimiento de *Trichoderma* spp. y de *F. graminearum* se basó en la metodología llevada a cabo por otros autores para probar la eficacia de fungicidas volátiles sintéticos y biofumigantes (8, 13, 25, 33, 43). Los dos tercios superiores de la parte aérea de las plantas de *B. juncea* se segaron y llevaron al laboratorio. El material cosechado se lavó con agua destilada estéril, se cortó en trozos pequeños y se trituró en una procesadora durante aproximadamente un minuto. El material triturado se colocó en recipientes de plástico de 900 ml, en dos dosis de 5 y 10 g.

Previamente, las cepas de *Trichoderma* spp. y *F. graminearum* se multiplicaron por separado en medio agar papa glucosado (APG) al 2%, durante siete días a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y oscuridad. Se extrajeron discos del cultivo de 5 mm de diámetro de la parte más externa de las colonias y de activo crecimiento micelial, y se transfirieron de a uno a cajas de Petri con medio APG al 2%. Las cajas de Petri con un disco de *F. graminearum* o de *Trichoderma* spp. se colocaron de a una dentro de los recipientes que contenían el biofumigante, apoyadas sobre soportes de plástico, quedando elevadas 2 a 3 cm por encima del material vegetal triturado. Los recipientes se cerraron con tapas plásticas. Para el tratamiento control se siguió la misma técnica pero no se utilizó material vegetal biofumigante.

Determinación del biocontrol de Trichoderma spp. sobre F. graminearum

Para analizar el potencial antagonico de *Trichoderma* spp. sobre *F. graminearum* se utilizó la técnica de cultivo dual (29). Se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo APG al 2%, un disco de 5 mm de diámetro de *F. graminearum* y otro de *Trichoderma* spp., ubicados a una distancia de 4 cm uno del otro. Las cajas de Petri se colocaron dentro de recipientes de plástico de 900 ml y éstos se cerraron con tapas.

Estudio de la combinación de Trichoderma spp. y la biofumigación con B. juncea para el control de F. graminearum

Para evaluar el efecto conjunto de *Trichoderma* spp. y la biofumigación con *B. juncea* sobre el crecimiento de *F. graminearum*, se utilizó el cultivo dual combinado con la técnica de biofumigación, anteriormente descriptos.

Incubación

En todos los ensayos, los recipientes de plástico con sus respectivos contenidos fueron incubados en cámara de crecimiento durante siete días, a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y oscuridad.

Evaluaciones

Finalizado el período de incubación, se midieron y analizaron los diámetros de las colonias de ambos microorganismos. En el cultivo dual se realizaron observaciones microscópicas en la zona de interacción de ambos microorganismos para identificar mecanismos antagonicos. A fin de evaluar el efecto combinado de *Trichoderma* spp.

y la biofumigación, se calculó el porcentaje de inhibición micelial de *F. graminearum* (I) mediante la siguiente fórmula (32, 39):

$$I = [(C-T)/C] \times 100$$

donde:

C = diámetro de la colonia del patógeno en el control

T = diámetro de la colonia del patógeno tratada con *Trichoderma* spp. y el biofumigante *B. juncea*

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones por tratamiento. El tratamiento de los datos se realizó mediante un ANOVA simple y la comparación de medias con la prueba de Tukey. Cuando los datos no cumplieron los supuestos de normalidad, homocedasticidad y aleatoriedad, se aplicó estadística no paramétrica mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Los datos se analizaron con el programa Statistica 7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la biofumigación con *B. juncea* sobre *Trichoderma* spp.

En todos los tratamientos, el hongo *Trichoderma* spp. colonizó íntegramente las cajas de Petri y sus colonias presentaron el mismo diámetro que el control sin biofumigante (p value = 1; $H = 0$) (tabla 1 y figura 1C; 1F; 1I, pág. 51). La biofumigación con *B. juncea* no inhibió el crecimiento de las colonias de *Trichoderma* spp. en ninguna de las dosis evaluadas.

Tabla 1. Efecto de la biofumigación con *B. juncea* sobre el crecimiento de las colonias de *Trichoderma* spp.

Table 1. Effect of biofumigation with *B. juncea* on the growth of colonies of *Trichoderma* spp.

Tratamiento	Diámetro promedio (mm)
Control	91,0 a
<i>B. juncea</i> - 5 g	91,0 a
<i>B. juncea</i> - 10 g	91,0 a

Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Kruskal-Wallis (p value = 1; $H = 0$).

Values with different letters indicate significant differences by Kruskal-Wallis's test (p value = 1; $H = 0$).

Los resultados de este trabajo concuerdan parcialmente con aquellos obtenidos por otros investigadores que analizaron el efecto de la biofumigación de otras Brassicáceas sobre *Trichoderma* spp. Por ejemplo Sanchi *et al.* (2005) demostraron en pruebas *in vitro* que la cepa T39 de *T. harzianum* fue menos sensible a los gases biofumigantes de *B. carinata* que *S. sclerotiorum* y *S. minor*; Galletti *et al.* (2008) analizaron *in vitro* el efecto de la biofumigación con harina de semilla de *B. carinata* sobre 40 aislados de *Trichoderma* spp., y hallaron que fueron menos sensibles a los gases que todos los patógenos ensayados (*P. ultimum*, *R. solani*, *F. oxysporum*), aunque observaron un efecto fungistático sobre *Trichoderma* spp. a la dosis más

alta del biofumigante. Por lo tanto, la biofumigación con Brassicáceas afectaría en diferente medida el crecimiento de *Trichoderma* spp., en función de la dosis, especie botánica y órgano utilizado del biofumigante.

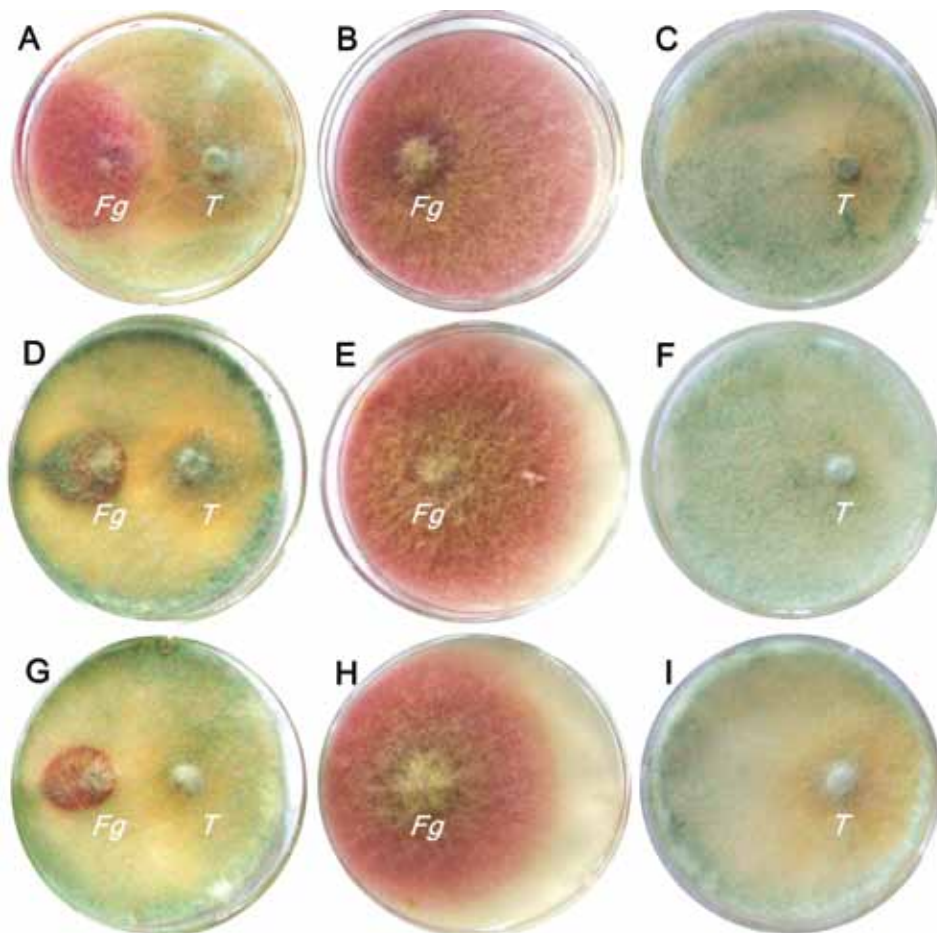


Figura 1. Crecimiento de las colonias de *F. graminearum* y *Trichoderma* spp. tratadas con *B. juncea*. A, B, C: sin biofumigante; D, E, F: con 5 g de *B. juncea*; G, H, I: con 10 g de *B. juncea*; Fg: *F. graminearum*; T: *Trichoderma* spp.

Figure 1. Colony growth of *F. graminearum* and *Trichoderma* spp. treated with *B. juncea*. A, B, C: without biofumigant; D, E, F: with 5 g of *B. juncea*; G, H, I: with 10 g of *B. juncea*; Fg: *F. graminearum*; T: *Trichoderma* spp.

Efecto de la biofumigación con *B. juncea* sobre *F. graminearum*

Las colonias de *F. graminearum* resultaron de diámetro similar a la del tratamiento control en las dos dosis utilizadas (p value = 0,3832) (tabla 2, pág. 52 y figura 1B; 1E; 1H). La biofumigación con *B. juncea* no inhibió el crecimiento de *F. graminearum*.

Tabla 2. Efecto de la biofumigación con *B. juncea* sobre el crecimiento de las colonias de *F. graminearum*.

Table 2. Effect of biofumigation with *B. juncea* on the growth of colonies of *F. graminearum*.

Tratamiento	Diámetro promedio (mm)
Control	89,0 a
<i>B. juncea</i> - 5 g	88,5 a
<i>B. juncea</i> - 10 g	87,0 a

Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey (p value = 0,3832).

Values with different letters indicate significant differences by Tukey's test (p value = 0.3832).

En un trabajo previo donde se evaluó *in vitro* el efecto fungistático de la biofumigación con *B. juncea* sobre *F. graminearum* (31), se observó inhibición del crecimiento del hongo con dosis de 10 g de *B. juncea*. Sin embargo, a diferencia del presente ensayo, el estadio fenológico de la mostaza parda fue el de plena fructificación y la temperatura de incubación fue 20°C. Posiblemente una o ambas disimilitudes en la metodología explicarían las diferencias halladas en los resultados. Por un lado, la concentración de glucosinolatos varía según el estadio fenológico de las Brassicáceas (25, 43). En cuanto a la temperatura de incubación, *F. graminearum* presenta una tasa de crecimiento mayor a 25°C que a 20°C (1). Todo lo anteriormente expuesto indicaría que la biofumigación con *B. juncea*, tendría un efecto variable sobre la supresión del crecimiento de *F. graminearum*, dependiendo del estadio fenológico de la mostaza y/o de la temperatura de incubación.

Acción de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *F. graminearum*

En el cultivo dual, las colonias de *F. graminearum* resultaron de diámetro significativamente menor que las del tratamiento control, en cambio las colonias de *Trichoderma* spp. presentaron el mismo diámetro que en el control (p value = 0,0003; H = 18,53) (tabla 3 y figura 1A; 1B; 1C, pág. 51). El hongo biocontrolador *Trichoderma* spp. inhibió significativamente el crecimiento de las colonias de *F. graminearum*. En observaciones microscópicas realizadas en la zona de interacción de ambos microorganismos se identificaron dos mecanismos antagonísticos de *Trichoderma* spp. sobre *F. graminearum*: micelio envolvente (coiling) y vacuolización.

Tabla 3. Acción antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *F. graminearum*.

Table 3. Antagonistic action of *Trichoderma* spp. on *F. graminearum*.

Tratamiento	Diámetro promedio de la colonia (mm)	
	<i>F. graminearum</i>	<i>Trichoderma</i> spp.
Control	89,0 a	91,0 a
Cultivo dual	35,0 b	91,0 a

Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Kruskal-Wallis (p value = 0,0003; H = 18,53).

Values with different letters indicate significant differences by Kruskal-Wallis's test (p value = 0.0003; H = 18.53).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores quienes observaron biocontrol de *F. graminearum* por acción antagonista de *T. virens* (40), *T. gamsii* y *T. velutinum* (24).

Efecto de la combinación de *Trichoderma* spp. y la biofumigación con *B. juncea* sobre el crecimiento de *F. graminearum*

La combinación del antagonista *Trichoderma* spp. y la biofumigación con *B. juncea* tuvo un efecto sinérgico en el control del crecimiento de *F. graminearum*: el porcentaje de inhibición micelial en los tratamientos que combinaban las dos técnicas fue significativamente mayor que el del tratamiento en el que solo se utilizó *Trichoderma* spp. No se observaron diferencias significativas entre las distintas dosis de *B. juncea* (p value = 0,0035) (tabla 4 y figura 1A; 1D; 1G, pág. 51).

Tabla 4. Efecto de la combinación de *Trichoderma* spp. y de la biofumigación con *B. juncea* sobre el crecimiento de *F. graminearum*, expresado a través del porcentaje de inhibición micelial.

Table 4. Combined effect of *Trichoderma* spp. and biofumigation with *B. juncea* on growth of *F. graminearum*, expressed as the percentage of mycelial inhibition.

Tratamiento	Porcentaje de inhibición micelial de <i>F. graminearum</i>
<i>Trichoderma</i> spp.	60,6 a
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. juncea</i> - 5 g	71,1 b
<i>Trichoderma</i> spp. + <i>B. juncea</i> - 10 g	73,2 b

Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey (p value = 0,0035).

Values with different letters indicate significant differences by Tukey's test (p value = 0.0035).

Este es el primer reporte sobre biocontrol *in vitro* de *F. graminearum* empleando en forma conjunta al hongo antagonista *Trichoderma* spp. y la biofumigación con *B. juncea*.

Otras investigaciones relacionadas con este tema han reportado resultados similares. Sanchi *et al.* (2005) observaron que la combinación de *T. harzianum* - T39 con la biofumigación con *B. carinata* no suprimió la actividad antagonista del hongo biocontrolador frente a *S. sclerotiorum* y *S. minor*, pero los metabolitos volátiles de *Trichoderma* redujeron la eficiencia de los isotiocianatos para inhibir el crecimiento micelial de esos patógenos; no obstante, concluyen que la biofumigación con *B. carinata* puede ser considerada compatible con la aplicación de *T. harzianum* - T39. Galletti *et al.* (2008) encontraron un efecto sinérgico de los dos métodos del control biológico, en un ensayo realizado en suelo bajo condiciones controladas, aplicando en forma separada y conjunta, *Trichoderma* spp. y la biofumigación con harina de semilla de *B. carinata*. Ellos midieron luego la incidencia de la mortalidad de plántulas de remolacha azucarera provocada por *P. ultimum* y observaron que el mayor control de la enfermedad se logró cuando la biofumigación se aplicó en combinación con *Trichoderma* spp.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos *in vitro* sugieren que la técnica de biocontrol con el hongo antagonista *Trichoderma* spp. puede ser considerada compatible con la biofumigación con *B. juncea*.

El crecimiento de *Trichoderma* spp. y su potencial efecto de biocontrol sobre *F. graminearum*, no serían afectados por la biofumigación con *B. juncea*.

Además, la utilización combinada de *Trichoderma* spp. y la biofumigación con *B. juncea*, tendría un efecto sinérgico sobre el control del crecimiento de *F. graminearum*. Esta combinación de prácticas de control biológico representaría una herramienta alternativa para el manejo integrado de las enfermedades causadas por *F. graminearum*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andersen, A. L. 1948. The development of *Gibberella zeae* headblight of wheat. *Phytopathology*. 38: 595-611.
2. Arriola, L. L.; Hausbeck, M. K.; Rogers, J.; Safir, G. R. 2000. The Effect of *Trichoderma harzianum* and Arbuscular Mycorrhizae on Fusarium Root Rot in Asparagus. *Hortecchnology*. 10(1): 141-144.
3. Astiz Gassó, M. M.; Pagliocca, R.; Varaschin, C. 2009. Comportamiento del formulado biológico Biagro TL en el manejo integrado de *Ustilago bullata* (Ustilaginales) en *Bromus catharticus*. Actas VII Simposio Nacional de Biotecnología Redbio. Rosario, Argentina. p. 151.
4. Astiz Gassó, M. M.; Pagliocca, R.; Varaschin, C. 2009. Comportamiento del formulado biológico Biagro TL en el manejo integrado del carbón hediondo (*Tilletia lavis*) en trigo. Actas XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Termas de Río Hondo, Argentina. PV05.
5. Astiz Gassó, M. M.; Pagliocca, R.; Varaschin, C. 2011. Comportamiento del formulado biológico Biagro TL en el manejo integrado de enfermedades. Actas 2° Congreso Argentino de Fitopatología. Mar del Plata, Argentina. p. 373.
6. Bai, G.; Shaner, G. 1994. Scab of wheat: Prospects for Control. *Plant Disease*. 78(8): 760-766.
7. Brunner, K.; Zeilinger, S.; Ciliento, R.; Woo, S. L.; Lorito, M.; Kubicek, C.; Mach, R. L. 2005. Improvement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* to Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance. *Applied And Environmental Microbiology*. 71(7): 3959-3965.
8. Charron, C. S.; Sams, C. E. 1999. Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by Shredded Leaves of *Brassica* Species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124(5): 462-467.
9. Dandurand, L. M.; Mosher, R. D.; Knudsen, G. R. 2000. Combined effects of *Brassica napus* seed meal and *Trichoderma harzianum* on two soilborne plant pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*. 46(11): 1051-1057.
10. Daugovish, O.; Downer, J.; Becker, O.; Browne, G. 2004. Mustard-derived biofumigation research in Southern California. In *Proceedings of the First International Biofumigation Symposium*. Florence, Italy. 38-39.
11. Debiase, G.; Rotolo, C.; Miazzi, M.; Pollastro, S.; Verdini, L.; De Mastro, G.; Faretra, F. 2008. Biofumigant activity of *Brassicaceae* against soil-borne fungi. In *Proceedings of the Third International Biofumigation Symposium*. Canberra, Australia. p. 59.
12. Deepak, P.; Saran, L.; Lal, G. 2008. Control of Wilt and Blight Diseases of Cumin through Antagonistic Fungi under *in vitro* and Field Conditions. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*. 36(2): 91-96.
13. Dunne, C. P.; Dell, B.; Hardy, G. E. S. 2003. The effect of biofumigants on the vegetative growth of five *Phytophthora* species *in vitro*. *Acta Hort.* 602: 45-51.
14. Galletti, S.; Sala, E.; Leoni, O.; Burzi, P. L.; Cerato, C. 2008. *Trichoderma* spp. tolerance to *Brassica carinata* seed meal for a combined use in biofumigation. *Biological Control*. 45(3): 319-327.
15. Gimsing, A. L.; Kirkegaard, J. A. 2006. Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of *Brassica* biofumigants. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 2255-2264.

16. Gowers, S. 2008. Selection of *B. napus* and *B. rapa* lines for biofumigation potential. In proceedings of the Third International Biofumigation Symposium. Canberra, Australia. p. 79.
17. Grondona, I.; Hermosa, R.; Tejada, M.; Gomis, M. D.; Mateos, P. F.; Bridge, P. D.; Monte, E.; Garcia-Acha, I. 1997. Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a Biological Control Agent against Soilborne Fungal. Applied And Environmental Microbiology. 63(8): 3189-3198.
18. Harding, R. B.; Wicks, T. J. 2001. Effects of incorporating *Brassica* and cereal cover crop residues on soil populations of *Verticillium dahliae*. In proceedings of the Second Soilborne Diseases Conference. Lorne, Australia. 148-149.
19. Howell, C. R. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. Plant Disease. 87(1): 4-10.
20. Kirkegaard, J. A.; Matthiessen, J. N. 2004. Developing and refining the biofumigation concept. Agroindustria 3: 233-239.
21. Kjaer, A. 1976. Glucosinolates in cruciferae. In: The Biology and Chemistry of the *Cruciferae*. London, Academic Press. 207-219.
22. Kullnig-Gradinger, C. M.; Szakacs, G.; Kubicek, C. P. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. Mycol. Res. 106(7): 757-767.
23. Larkin, R. P.; Griffin, T. S. 2007. Control of soilborne potato diseases using *Brassica* green manures. Crop Protection. 26(7): 1067-1077.
24. Matarese, F.; Sarrocco, S.; Gruber, S.; Seidl-Seiboth, V.; Vannacci, G. 2012. Biocontrol of Fusarium head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. Microbiology. 158: 98-106.
25. Mayton, H. S.; Olivier, C.; Vaughn, S. F.; Loria, R. 1996. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl-isothiocyanate production in macerated leaf tissue. Phytopathology. 86: 267-271.
26. McMullen, M.; Jones, R.; Gallenberg, D. 1997. Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devastating Impact. Plant Disease. 81: 1340-1348.
27. Michel, V. V.; Lazzeri, L. 2008. Biofumigation to control *Verticillium* wilt influenced by plant species and soil types. In Proceedings of the Third International Biofumigation Symposium. Canberra, Australia. p. 62.
28. Molina-Vargas, L. F.; Bentura-Castellanos, J. U. 2009. Efecto inhibitorio *in vitro* de cinco isotiocianatos sobre *Rhizoctonia solani* Kühn AG-3. Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 37-40.
29. Morton, D. T.; Stroube, N. H. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of microorganism upon *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology. 45: 419-420.
30. Parry, D. W.; Jenkinson, P.; McLeod, L. 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals - a review. Plant Pathology. 44(2): 207-238.
31. Perniola, O. S.; Staltari, S.; Chorzempa, S. E.; Molina, M. del C. 2012. Biofumigación con Brassicáceas: actividad supresora sobre *Fusarium graminearum*. Rev. Fac. Agron. 111(1): 48-53.
32. Rekha, D.; Patil, M. B.; Shridhar Shetty, P.; Swamy, K. M.; Rajini, B. Gamanagatti. 2012. In vitro screening of native *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of ground nut. International Journal of Science and Nature. 3(1): 117-120.
33. Richardson, L. T.; Munnecke, D. E. 1964. A bioassay for volatile toxicants from fungicides in soil. Phytopathology. 54: 836-839.
34. Sanchi, S.; Odorizzi, S.; Lazzeri, L.; Marciano, P. 2005. Effect of *Brassica carinata* Seed Meal Treatment on the *Trichoderma harzianum* T39-*Sclerotinia* Species Interaction. Acta Hort. (ISHS). 698: 287-292.
35. Shovan, L. R.; Bhuiyan, K. A.; Begum, J. A.; Pervez, Z. 2008. *In vitro* control of *Colletotrichum dematium* causing anthracnose of soybean by fungicides, plant extracts and *Trichoderma harzianum*. Int. J. Sustain. Crop Prod. 3(3): 10-17.
36. Sivan, A.; Chet, I. 1989. Degradation of Fungal Cell Walls by Lytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*. Journal of General Microbiology. 135: 675-682.
37. Stefanova, M.; Sandoval, I.; Martínez, M. L.; Heredia, I.; Ariosa, M. D.; Arévalo, R. 2004. Control de hongos fitopatógenos del suelo en semilleros de tabaco con *Trichoderma harzianum*. Fitosanidad. 8(2): 35-38.
38. van Os, G. J.; Bijman, V.; de Boer, M.; Breeuwsma, S.; van der Bent, J.; Lazzeri, L. 2004. Biofumigation against soilborne fungal diseases in flower bulbs. In Proceedings of the First International Biofumigation Symposium. Florence, Italy. 21-22.
39. Vincent, J. M. 1947. The esters of 4-hydroxybenzoic acid and related compounds. Part I. Methods for the study of their fungistatic properties. J. Soc. Chem. Ind. 66: 149-155.
40. Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Expt. Bot. 52: 487-511.
41. Yedidia, I.; Benhamou, N.; Chet, I. 1999. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology. 65(3): 1061-1070.

42. Yulianti, T.; Sivasithamparam, K.; Turner, D. W. 2008. Incorporation of *Brassica nigra* and *Diplotaxis tenuifolia* residues and incubation under different soil conditions affects the survival of *Rhizoctonia solani* AG2-1 (ZG5), the causal agent of damping off of canola differently. In Proceedings of the Third International Biofumigation Symposium. Canberra, Australia. p. 70.
43. Zurera, C.; Romero, E.; Porras, M.; Barrau, C.; Romero, F. 2007. Efecto biofumigante de especies de *Brassica* en el crecimiento de *Phytophthora* spp. *in vitro*. XI Congreso Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Albacete, España. Actas de Horticultura. 48: 306-309.